

**ACTIVATION OF MACROPHAGE TUMORICIDAL ACTIVITY BY  
GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR**

Patent Number: ☐ US5078996  
Publication date: 1992-01-07  
Inventor(s): CONLON III PAUL J (US); GRABSTEIN KENNETH H (US)  
Applicant(s): IMMUNEX CORP (US)  
Requested Patent: ☐ JP62089621  
Application Number: US19860888995 19860731  
Priority Number (s): US19860888995 19860731; US19850766893 19850816  
IPC Classification: A61K37/66; A61K45/05  
EC Classification: C07K14/535  
Equivalents: AU586876, AU6103186, DE3685918D, DE3685918T, ☐ DK382986, ☐ EP0211684, A3, B1, JP2043817C, JP7080781B

**Abstract**

Macrophages and precursor monocytes are activated to exhibit tumoricidal activity by stimulation solely with granulocyte-macrophage colony stimulating factor. A patient suffering from tumors can be treated by direct administration of therapeutically effective quantities of activated granulocyte-macrophage colony stimulating factor. Homogeneous granulocyte-macrophage colony stimulating factor for use in activating macrophages and monocyte precursors is prepared by recombinant DNA techniques. The gene coding for granulocyte-macrophage colony stimulating factor is isolated and then recombinant protein product expressed in an appropriate expression system. The granulocyte-macrophage colony stimulating factor recovered from the expression system is purified to homogeneity by reverse phase high-performance liquid chromatography.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-89621

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)4月24日

A 61 K 35/14  
35/26  
35/74

7138-4C

7138-4C

7138-4C ※審査請求 未請求 発明の数 4 (全16頁)

⑮ 発明の名称 グラニューロサイト-マクロファージ コロニー刺激 因子によるマ  
クロファージ殺腫瘍作用の活性化

⑯ 特 願 昭61-191561

⑰ 出 願 昭61(1986)8月15日

優先権主張 ⑱ 1985年8月16日 ⑲ 米国(US) ⑳ 766893

㉑ 発 明 者 デイク・エム・アン アメリカ合衆国ワシントン州98107, シアトル, ノース・  
ダーソン ウェスト・ファイティエイス・ストリート 1757

㉒ 発 明 者 マイケル・エイ・キャ アメリカ合衆国ワシントン州98103, シアトル, ミッドヴ  
ントレル エイル・アベニュー・ノース 4035

㉓ 出 願 人 イミュネックス・コー アメリカ合衆国ワシントン州98101, シアトル, ユニバー  
ポレーション シティ・ストリート 51, イミュネックス・ビルディング  
600

㉔ 代 理 人 弁理士 湯 浅 恭 三 外5名  
最終頁に続く

明細書の序言(内容に変更なし)

明 細 書

1. [ 発 明 の 名 称 ]

グラニューロサイト-マクロファージ  
コロニー刺激因子によるマクロ  
ファージ殺腫瘍作用の活性化

2. [ 特 許 請 求 の 範 囲 ]

(1) マクロファージ系細胞を有効量のグラニューロ  
サイト-マクロファージ コロニー刺激因子で処  
理することよりなる、マクロファージ系の細胞の  
殺腫瘍活性を増大する方法。

(2) 特許請求の範囲第1項の方法で製造した細胞  
と共に腫瘍細胞をインキュベートする工程よりな  
る腫瘍細胞を不活性化する方法。

(3)a) 提供者の体内からマクロファージ系の細胞  
を単離し、

b) 該単離細胞を有効量のグラニューロサイト-  
マクロファージ コロニー刺激因子と接触さ  
せ、そして

c) 該細胞を受容者の体内に導入する、  
ことよりなる、癌の治療方法。

(4) 哺乳動物の体内に有効量のグラニューロサイ  
ト-マクロファージ コロニー刺激因子を導入する  
工程よりなる、癌の治療方法。

(5) グラニューロサイト-マクロファージ コロニー  
刺激因子の体内への導入を、注射、経口投与、煙  
霧剤の吸入、経皮吸収、口腔吸収または直腸坐剤  
により行う、特許請求の範囲第4項記載の方法。

(6) 注射の方法が、皮下、筋肉内、腹腔内、およ  
び静脈内注射から選ばれる、特許請求の範囲第5  
項記載の方法。

(7) グラニューロサイト-マクロファージ コロニー  
刺激因子が組換えDNA技術で製造される、特許  
請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に  
記載の方法。

(8) グラニューロサイト-マクロファージ コロニー  
刺激因子を、骨髓細胞コロニー形成試験で測定し  
たとき少なくとも約  $1.5 \times 10^6$  コロニー形成単位/  
 $\mu g$  蛋白質の比活性を示すまで精製する、特許請  
求の範囲第1項ないし第7項のいずれか1項記載  
の方法。

(9) マクロファージが末梢血液のモノサイト由来である特許請求の範囲第1項ないし第8項のいずれか1項記載の方法。

(10) マクロファージ系細胞の $2 \times 10^5$ 細胞あたり、約0.01ないし100ナノグラムのグラニューロサイト-マクロファージコロニー刺激因子を使用する、特許請求の範囲第1項ないし第3項または第7項ないし第9項のいずれか1項記載の方法。

### 3. [発明の詳細な説明]

#### (産業上の利用分野)

本発明はマクロファージの活性化に関し、より詳細には、マクロファージおよび前駆体モノサイトを単にグラニューロサイト-マクロファージコロニー刺激因子(以下、GM-CSFと呼ぶ)で刺激することにより、殺腫瘍活性をあたえることに関する。

#### (従来技術)

マクロファージは骨髓に由来する血液中のモノサイトから発達する、活発に動く、比較的大きい(10~20 $\mu$ m)食細胞である。マクロファージは、

等、J.Clin.Invest., 72:304(1983)を参照。

MAFが他のものとは別のリンフォカインであるか又は全体的にもしくは部分的に他のリンフォカインでできているかは解明されていない。或る研究者はネズミの系ではMAFがガンマ-インターフェロン(IFN- $\gamma$ )から構成されていると示唆している。ロバートおよびバシル(Roberts and Vasil), J.Interferon Res., 2:519(1982)およびスベデルスキー(Svedersky)等、J.Exp.Med., 159:812(1984)を参照。

然しながらIFN- $\gamma$ 以外のリンフォカインもマクロファージを腫瘍細胞を殺しうる程度まで活性化することがあると考えられている。マクロファージは表皮細胞を刺激し、傷の治癒を助け、炎症や発熱の原因となることが知られているリンフォカイン-インターロイキン1(IL-1)を生産する。オノザキ(Onozaki)等、J.Immunol., 135:314(1985)は、最近IL-1も新鮮なモノサイトの殺腫瘍細胞活性を増大させることを示

活性化により、膜のしわ発生、過酸化物の同化、Ia抗原の発現増大およびプラスミノーゲンの分泌増大などをふくむ数種の機能的、生化学的および形態的变化を受けることが観察されている。またマクロファージは免疫系の重要要素と考えられている。活性化されるとマクロファージは外来の粒子や老化細胞の破壊に関連すると考えられており、最近では新生物による病気に耐性をあたえ、および/または除去することがつきとめられている。これらの活性を発揮する活性化マクロファージおよび前駆体モノサイトの発生には、有効な活性化信号および受容単核食細胞の共存が必要である。

マクロファージの活性化はマクロファージ活性化因子またはMAFと呼ばれるある種のリンフォカインにより誘発されることは一般に認められている。カメロン(Cameron)等、J.Clin. Invest., 63:977(1979); マンタバニ(Mantavani)等、Int.S.Cancer, 25:691(1980); およびクライネルマン(Kleinerman)

唆している。

マクロファージおよび前駆体モノサイトもまた種々の物質での処理により活性化されて殺腫瘍細胞作用を示しうると報告されている。例えばバクテリア産物リポポリサッカライド(LPS)[ゾーン(Sone)等、Cancer Res., 42:2227(1982)]、ムラミルジペプチド(MDP)のようなペプチドグリカン[ナガオ(Nagao)等、Infect.Immun., 24:304(1979)、クライナー(Kleiner)等、Cancer Res., 43:2010(1983)]。

他のマクロファージ活性化物質には、腫瘍プロモーター・フォルボール・ミリステート・アセテート(PMA)、ピック(Pick)等、Ann.N.Y. Acad.Sci., 332:378(1979)およびイオノフォア類、ピック等(同上)およびフンド(Hund)等、Nature(ロンドン), 265:543(1979)がある。

最近の報告によれば、マクロファージが非特異的殺腫瘍活性を発揮するための効果的活性化は単一の信号の結果ではなく、一連の反応が必要であ

ることが示唆された。メルツァー (Meltzer) は『リンフォカイン』, ピックおよびランディー (Pick and Landy) 編, アカデミック プレス, ニューヨーク, 第319〜343頁のなかで、マクロファージが活性化されて殺腫瘍活性を示すには、反応場所、例えば感染部位に血液のモノサイトが補給または集積され、モノサイトがその場所で能力ある単核食細胞に分化すると仮定している。この最初のモノサイトの分化段階の後、モノサイトはリンフォカインからの最初の信号によつて受容状態にとブライミングされる。このブライミングされたマクロファージが最終的に成熟して細胞毒性を有するには、例えばLPSから由来する第二の信号を通した引金が必要である。一定レベルのマクロファージ活性化に必要なブライミング信号(リンフォカイン)と引金信号の濃度は、これらを直列に使用すると、これらの信号を単独で使用した場合に比べて遙かに低く、これらの信号の間には相乗作用的協力が存在することが示唆される。

LPSとIFN- $\gamma$ についてもリンフォカイン-

存在するCSFの種類に依存する。例えば、エリスロポエチンは親細胞を赤血球に成熟させ、一方トロンボポエチンは親細胞を血小板への過程へ誘導すると信じられている。同様にグラニューロサイト-マクロファージコロニーの形成は、GM-CSFの存在に依存する。GM-CSFも含めたCSFが骨髓親細胞から白血球への成熟および増殖へと誘発する能力は充分知られているが、GM-CSFが単独でマクロファージまたは前駆体モノサイトを活性化して、非特異的殺腫瘍活性に介在することは従来知られていない。

(発明の目的)

本発明によれば、マクロファージまたはモノサイト前駆体がGM-CSF信号のみにより、活性化され非特異的殺腫瘍活性を介在する。活性化マクロファージまたはモノサイト前駆体は、インビボまたはインビトロで腫瘍細胞を不活性化するために使用出来る。腫瘍で苦しんでいる患者の体内からマクロファージ、モノサイトまたはその前駆体を取り出し、該細胞を治療有効量のGM-CSFと

LPSと似た関係が報告されている。シュルツ (Schultz), J. Interferon Res., 2:459 (1982)。組み換えDNA技術は、インビトロ細胞バイオアッセイの発達とともに、IFN- $\gamma$ , IL-1および他のリンフォカインのcDNAのクローニングをもたらした。高度に純粋な組み換え由来のIFN- $\gamma$ はそのMAF活性に関する従来の報告を確認し、さらに非特異的殺腫瘍活性を発揮するために効果的にIFN- $\gamma$ を誘発するためにはLPSのような第二の引金信号が必要であるという報告も確認された。

本発明は、GM-CSFを使用してマクロファージおよび前駆体モノサイトを刺激し、非特異的殺腫瘍活性を仲介させることに関し、この活性化は共同刺激因子、例えばLPSまたはIFN- $\gamma$ の存在には依存しない。GM-CSFは特定の種類のコロニー刺激因子(CSF)である。CSFはリンフォカインの仲間であり骨髓中に見出される親細胞を特定の種類の成熟血液細胞への分化を誘発する。この親細胞から生じる成熟血液細胞の特定種類は、

ともに培養することにより、刺激して殺腫瘍活性化を発現させることにより、該患者を治療することができる。その後刺激された細胞をその患者に投与し、活性化細胞により該患者を苦しめている腫瘍細胞を探しだして破壊することができる。別の方法として、GM-CSFを直接静注、皮下注射、腹腔内注射または筋肉内注射によりまたは鼻腔からの吸入により患者に投与してもよい。本発明によれば活性化マクロファージを使用して、癌患者はエンドトキシン、放射活性物質または他の有害な物質に接することなく治療できることが重要である。

本発明に使用する充分な量の均一なGM-CSFは組換えDNA技術により製造できる。GM-CSFをコードする遺伝子を単離し、組み換え蛋白質を高いレベルで発現できる系で使用するために遺伝子工学的に処理する。発現宿主から回収したGM-CSFを逆相高性能液体クロマトグラフィーで均質に精製する。

活性化されたマクロファージまたは前駆体モノ

サイトが特定の腫瘍を破壊する効果を証明する方法は、マクロファージまたはモノサイト前駆体を種々の濃度のGM-CSFとともに培養する工程をふくむ。適当な培養期間の後、GM-CSFを除き、次に標的腫瘍細胞を放射活性で標識してから、前記活性化マクロファージエフェクター(攻撃)細胞を作用させる。さらに培養したのち、破壊された標的細胞を取り除き、残存する標的細胞を溶解して、活性化マクロファージへの暴露に対して生き残った細胞の数を定量的指標として計数した。

#### 前駆体モノサイトの調製

末梢血液モノサイトの形のマクロファージをフイコールおよびパーコール分離を含む標準的技術で精製し、引き続きGM-CSFでの活性化に使用した。この操作における最上のモノサイト層を培地にプレーティングし、次いで非付着性細胞を除去し、のこりのモノレイヤー細胞をGM-CSFおよび他のLPSやIFN- $\gamma$ をふくむ活性化剤の添加によつて活性化できるようにした。エンドトキシンなどの混在を防止するため、細胞分離工程に使

用した各試薬はリムラス・アメボサイト・リゼート(Limulus Ameobocyte Lysate)で試験した。更に、細胞集団はエンドトキシンを含まない緩衝液および培地で調製した。

末梢血液から単離するかわりに、モノサイトまたは成熟マクロファージは他の供給源、例えば脾臓細胞、リンパ節細胞または肺洗浄物に由来しても良い。

#### 組換えGM-CSFの調製およびGM-CSF遺伝子のクローニング

GM-CSFは生体内では非常に少量しか生産されない。本発明によれば、組換え技術により、モノサイトおよびマクロファージの活性化に使用するための比較的少量の高度純化GM-CSFが生産できる。そのような蛋白質生産のための組換えDNA技術に関する議論は、Science, 196, (1977年4月)の論説および追加論文に記載されている。この参考文献で論じられている組換えDNA技術を利用するためGM-CSFをコードする遺伝子をcDNAライブラリーから、例えばニッ

クトランスレーションされたcDNAプローブを使つてまず単離する必要がある。そのような標識プローブは、ネズミGM-CSFのヌクレオチド配列部分に相当する合成オリゴヌクレオチドプローブを使用し、ネズミGM-CSFのcDNAライブラリーから誘導された。

ヒトGM-CSF遺伝子の分子クローンを単離するために、リンフォーマ細胞、例えばHUT-102, Jurkat またはHL60または他の種類の供給源例えばヒト末梢血液単核球細胞から全RNAを抽出した。鳥のミエロ بلاスト-シスウイルス(MV)の逆転写酵素を使用してポリアデニル化mRNAの逆転写によりcDNAライブラリーを作成した。このDNAをDNAポリメラーゼIを用いて二重鎖にし、適当なクローニングベクター、例えばプラスミド、バクテリオファージまたはコスミッド中に挿入した。次いで得られた組換えクローニングベクターを適当な宿主、例えば大腸菌(Escherichia coli (E.coli))、イーストまたは他の単細胞生物の形質転換に使用した。

形質転換宿主を同定し、グループに分けてプールした。これらのプールから調製したプラスミドDNAを $^{32}\text{P}$ で放射標識したニックトランスレート化cDNAネズミGM-CSFプローブとハイブリッド形成させた。プローブに陽性の信号を与えたクローンのプールを同定し、次いで候補のプールをさらに分割し、ハイブリッド形成スクリーニングを繰り返した。最後にヒトGM-CSF遺伝子に相当する単一の形質転換体が同定された。この形質転換体からプラスミドDNAを調製し、例えばサンガー等、Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 70:5463により、提唱された標準的チェーンターミネーション法を用いるDNA配列決定により同定した。

第1図はヒトGM-CSF遺伝子のヌクレオチド配列を示す。ヒトGM-CSF遺伝子のコード領域はヌクレオチド1614からヌクレオチド16394におよぶ。ヌクレオチド配列から決定した相当するアミノ酸配列は、関連コドンの下に示す。同定された陽性コロニーから調製されE.coli中に形

質転換され、pHG23 と命名されたプラスミド DNA はアメリカン・タイプカルチュア・コレクション (ATCC), [12301 パークローンドライブ, ロックビル, メリーランド 20852 米国] に受託番号 4639900 として寄託されている。

#### 機能性 GM-CSF の発現

宿主中の pHG23 中に含まれる GM-CSF 遺伝子の発現により、機能性 GM-CSF を製造し、発現生産物が寒天中で骨髓細胞コロニーの増殖を刺激する能力を試験した。第 1 図に示す GM-CSF 遺伝子の実質的に完全コード領域である cDNA フラグメント (Sfa NI から Nco I までのフラグメント) を酵母細胞から GM-CSF の合成および分泌を指令するようにデザインした発現ベクター (例えば第 2 図に示すような pYafGM-2 と命名されたベクター) 中に挿入した。例えば pYafGM-2 のような発現ベクターは、好ましくは複製起点およびアンピシリン-耐性遺伝子 (Amp<sup>r</sup>) を含むプラスミド pBR322 由来の配列 (第 2 図の太線部分) を含む。理想的には、発現ベクターは

酵母からの配列例えば選択マーカーとしてのトリプトファン-1 遺伝子 (TRP-1) および複製の 2 $\mu$  酵母オリジンをも含む。発現ベクターはまた好ましくは更に、酵母 pre-pro- $\alpha$  接合因子 ( $\alpha$ -ファクター) (点線部分) を効果的プロモーターとして、酵母宿主中で GM-CSF の合成および分泌を指令するリーダー配列 (その後第 1 図の GM-CSF のコード領域が続く (ハッチング部分)) とともに含む。 $\alpha$ -ファクター遺伝子の構造は、クルジャンおよびヘルスコビッツ (Kurjan and Herskowitz), Cell, 30:933-9438 (1982) に記載されている。

pYafGM-2 発現プラスミドを適当な株の酵母 (*S. cerevisiae*) 中に形質転換した。好ましい酵母株は 4679, X2181-1B, DBY746, YNN280 および 20B-12 が含まれる。これらの株は、 $\alpha$ -ファクタープロモーターとの適合性および Trp<sup>+</sup> 形質転換体の選択に関して、全て  $\alpha$ , Trp 1, Leu 2 である。これらの株は全て一般に入手可能であり、例えばストレイン 4679 は

Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California, Berkeley, California 94702 から入手出来る。

bIL-2 遺伝子を含む組換え発現プラスミドによる酵母宿主の形質転換は、スフェロブラストを形成させ、次いでプラスミド取り込みの前に洗浄する公知の方法で行った。この方法のための処方は確立されている。例えば、ベッグス (Beggs), Nature (London), 275:104 (1978) および ヒンネン等, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 75:1929 (1978) を参照。

酵母醗酵上澄の生物学的活性をヒト骨髓細胞からのグラニューロサイトおよびマクロファージタイブコロニーの混合形成の能力に関して検定した。対照として、プラスミド pYafGM-2 と同じ構造であるが、GM-CSF 配列を欠失したプラスミド pYaf もまた酵母宿主に形質転換して醗酵上澄の生物学的活性を検定した。pYafGM-2 の上澄は骨髓アッセイにおいて高レベルの GM-CSF 活性

の合成を指令することが見出され (培養 1 ml 当たり  $1.2 \times 10^6$  コロニー形成単位 (CFU-c/ml))、これに対して、pYaf 対照プラスミドから誘導された上澄には活性は全く検出されなかつた。

#### 組換え GM-CSF の精製

発現宿主細胞の上澄の中に含まれる組換え GM-CSF は、逆相高性能の液体クロマトグラフィー (HPLC) で実質的に均一に精製した。本発明で使用する HPLC の方法においては、好ましくは逆相、テトラメチル、オクタデシル、オクチルメチルまたはジフェニル-結合シリカカラムであつて、GM-CSF 蛋白質への使用が最適であるほど十分に大きい孔径、即ち少なくとも 300Å のものである。

本発明で使用する逆相 HPLC カラムは市販されている。この目的のために好ましいカラムは、セパレーションズ グループ (Separations Group), Hesperia, CA から市販されているビダック (Vydac) 系列のカラムである。例えば、本発明は、平均粒子サイズ 30 ないし 33 ミクロ

ンに選別された孔径300Åのシリカゲルの表面に結合されたシロキサン(シリカ-酸素-シリカ)によつて共有結合したテトラメチルシラン基よりなるビダックC4またはC18吸着逆相カラムを使用できる。

カラムに適用する前に、発現されたGM-CSFを適当な酸、例えばトリフルオロ酢酸(TFA)を使つて酸性にする。HPLCカラムからの蛋白質の溶出は、公知の方法で行う。カラムからの結合蛋白質を除去するための溶出の適当な方法はアセトニトリルの直線勾配の使用を含む。この目的のための好ましい勾配は、TFA(pH2.0-2.1)中の0-100%(vol/vol)アセトニトリル勾配である。

溶出された蛋白質は当業者に公知の検出手段で都合よくモニターできる。例えばHPLCカラムから溶出されたフラクション中の蛋白質の相対濃度は、溶出された材料を光波長214ナノメートルの自動紫外線スペクトロフォトメーターで吸光度を測定することによつて決定することができる。

CSF活性を持つ二つのバンドが同定された。これらのバンドは、酵母が製造したグリコシル化(21,000)および非グリコシル化(17,000)GM-CSFに相当する。骨髓コロニー形成アッセイにおいて、Fxn57の活性程度は $1.5 \times 10^7$  CFU-c/mlであつた。この均質GM-CSFの比活性は約 $1.5 \times 10^6$  CFU-c/ $\mu$ g蛋白質または $3.0 \times 10^{16}$  CFU-c/モルであつた。

#### 標的細胞の調製

モノサイト/マクロファージの殺腫瘍状態への活性化は種々のタイプの腫瘍細胞を使用してアッセイした；例えばA375ヒトメラノーマ細胞ライン(ATCC #CRL1619)、ヒト膀胱癌(bladder squamous carcinoma) SCaBER(ATCC #HTB3)、ヒト星細胞腫胚芽腫U-87MGおよびU-373 MG(ATCC #HTB14および17)、ヒトエビング(Ewing) ザルコーマEsa-1およびSK-ES-2(ATCC #HTB83およびHTB87)、ヒト悪性メラノーマSK-MEL-28およびSK-MEL-31(ATCC #HTB

適当な自動紫外線光吸収検出手段は、Milford, MEのウォーターズ アソシエート社(Waters Associates)から入手できる。

HPLCから回収したフラクションにつき、後記の実施例4に示すとおり、フルオレスカミンアッセイおよびSDS(ドデシル硫酸ナトリウム)ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびそれに続く銀染色で蛋白質の検出を行う。回収されたGM-CSFはFxnと命名され、前記および実施例3のようにして骨髓コロニー形成アッセイにより、生物学的活性を調べる。

もし、最初のHPLCで十分な蛋白質の精製が果たされなかつたときは、同じカラムまたは異なるタイプのカラムを使用して操作を繰り返すことが出来る。さらに同一または異なる溶出剤を使用してよい。HPLCを二段階で実施することによつて、GM-CSFは生物学的活性が単一对称ピークを示すまでの均一度に精製された。第5図に示すとおり、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、分子量約21,000および17,000ダルトンのGM-

72およびHTB73)、ヒト肝臓癌SK-Hep-1(ATCC #HTB-52)、ヒト脾臓癌MIA PACA-2(ATCC #CRL-1420)およびヒト膀胱癌5637(ATCC #HTB-9)を使用した。アッセイに先立つて標的細胞を種々の添加物、例えば胎児牛血清(FCS)で強化した培地中でモノクローに増殖させた。次に標的細胞を例えば $[^{125}\text{I}]$ ヨードウリジン $[(^{125}\text{I})\text{IUdR}]$ で放射標識した。標識方法の標準手順は、クライナーマン(Kleinerman)等、前述、およびオノザキ、前述、に記載されている。

#### 殺腫瘍活性のアッセイ

候補アクチベーター物質、即ち、GM-CSF、IFN- $\gamma$ 、LPSの種々の濃度を、上記で用意したプレーティングされたモノサイトに加えた。適当な培養期間、即ち24時間後に、試験物質を除去し、培養ウェルに放射標識標的細胞を加えた。初期インキュベーション期間を更に置いた後、培養上澄を除去して新鮮な培地に交換した。次いで最終培養期間の後、活性化モノサイトで殺された標

的細胞を除去し、各ウェル中の残存生存細胞を適当な試薬、例えばNaOHで溶解する。次いで溶解物の放射活性をガンマカウンターで測定する。放射標識標的細胞を含むが活性化モノサイトを含まないウェルを標的細胞の活性の対照として用いる。

活性化モノサイトに介在される殺細胞活性は次のように計算される：

無処理での殺細胞性%

$$= 100 - \frac{\text{モノサイトと培養した標的細胞の cpm}}{\text{標的細胞のみでの cpm}} \times 100$$

活性化モノサイトに介在される特異的殺細胞性%

$$= 100 - \frac{\text{活性化モノサイトと培養した標的細胞の cpm}}{\text{対照モノサイトと培養した標的細胞の cpm}} \times 100$$

第3図および第4図は、種々の濃度の組換えヒトGM-CSF, LPS, IFN- $\gamma$  またはLPSとIFN- $\gamma$  とともに活性化したヒト末梢血液モノサイトの殺腫瘍活性を説明するものである。特に第3図は、LPSおよびIFN- $\gamma$  の単独およびマクロファージ介在腫瘍標的破壊を誘発するために組合せたLPSおよびIFN- $\gamma$  の用量依存性効果を示す。

学的活性は、従来知られていなかった。

#### 腫瘍患者の治療

上記のような調製した精製組換えGM-CSFは、腫瘍患者または哺乳動物を種々の治療法で治療するために使用できる。治療を要する患者に治療有効量のGM-CSFを一般的な種々の経路、例えば非経口または経皮膚投与法で投与できる。一般に、組換えGM-CSFは1日当り患者体重1kgにつき、約1.0ないし $10^6 \mu g$ の量で投与できる。好ましくは、治療はこの範囲の低用量で開始して、望まれる治療効果が達成される用量まで増加される。さらに、用量の変更は種々の因子、例えば治療される患者の状態によっても必要になる。いずれにしても、投与責任者が各患者について適当な用量を決定するであろう。

非経口投与のためには、組換えGM-CSFは、例えば皮下、筋注、腹腔、または静注により、単一もしくは複数用量で患者に投与される。別法として、GM-CSFはエアロゾル吸入、経皮、経口腔または直腸坐剤として投与してもよい。注射用

第3図はまた、組換えGM-CSFを含む種々の濃度の酵母上澄の活性も示す。第3図に描かれているとおり、この酵母上澄は1:500(200CFU-c/ml)の希釈でマクロファージを活性化して約65%の特異的殺細胞性を発揮した。これもまた第3図に記載されているとおり、対照酵母発酵上澄は、マクロファージ細胞毒性を誘発することはできなかった。粗酵母上澄は、約 $1-2 \times 10^5$  CFU-c/mlのタイターを有していた。

第4図は、精製組換えヒトGM-CSFの用量依存力価の全範囲を示している。第4図に説明したとおり、マクロファージ介在腫瘍細胞殺細胞性の最大誘発の $\frac{1}{2}$ は、均一GM-CSFを含むカラムフラクションの約1:1,000,000希釈(15CFU-c/ml)で生じた。IFN- $\gamma$ , LPSおよびIFN- $\gamma$ と組合せたLPSの殺細胞性を説明する対照データもまた第4図に示す。

上記から明らかなおとおり、GM-CSFはモノサイトの殺腫瘍細胞活性を誘発する単一信号として効果的に作用した。このようなGM-CSFの生物

投与のためには、組換えGM-CSFのゴマ油、ピーナツ油または水性プロピレングリコール中の溶液ならびに蒸留水、血清アルブミン、リンゲル液、ハンクス液、その他の無菌、非毒性、非アレルギー性溶液を使用できる。そのような溶液は必要に応じて適当に緩衝化でき、また液体希釈剤は十分量の食塩またはグルコースで等張にしておくこともできる。

別の治療方法として、マクロファージまたはその前駆体細胞を提供者から単離し、該細胞を治療有効量のGM-CSFとともに培養することによつて、殺腫瘍活性をもつように刺激することができる。この活性化マクロファージもしくは前駆体細胞を、次に上記技術の一つを用いて受容者に投与することができる。全ての場合ではないが、典型的には提供者と受容者は同一個人である。

本発明の治療方法は、実質的に全ての型の腫瘍、特に固型癌に対して採用可能である。そのような腫瘍には、膀胱、腎臓、鱗状細胞、肺、肝臓、胸部、および大腸の各所の癌を全て含む。腫瘍には、

全てのメラノーマやザルコーマも含まれる。

以下の実施例により、本発明の方法および発明物を詳述する。実施例は単に例示の目的で記載するものである；本発明を説明し、当業者が本発明を追試および利用する助けとするために記載する。実施例によつて本発明の範囲を限定しようとするものではなく、特許権成立後の発明の範囲は、特許請求の範囲によつて定められる。

#### 実施例 1

##### 末梢血液モノサイトの調製

リムラス・アメボサイト・リゼート〔ホイットメーカー・エム・エイ・バイオプロダクツ (Whittaker M.A. Bioproducts), ウォーカー・スビル, MA〕を使用してパイロジェンを含まないことを調べた試験薬を使用して、末梢血液モノサイトのパフィーコート（白血球）部分〔ポートランド, オレゴンの赤十字から入手〕を精製した。各パフィーコートを、ロスウェル・パーク・メモリアル・インスティテュート (RPMI)-1640 培地とヘパリン (50U/ml, シグマ社, セントルイス,

MO) で希釈して細胞 200 ml とし、アイソリンフ (Isolymp)〔ギャラード・シュレジンガー (Gallard-Schlesinger), カールブレス, ニューヨーク) 上に重ね、1400×g で25分間遠心した。層間の細胞（単核白血球）を洗浄して、4~5×10<sup>7</sup>細胞/2 ml の濃度で連続パーコール (ファルマシア・ファイン・ケミカルズ) 上に重ねて、200×g で20分間4℃で遠心し、モノサイトを残りの単核白血球から分離した。得られた頂部のモノサイト層を回収し、5%FSCを含むRPMI-1640で洗浄し、RPMI-1640および5%FCSとともに96穴平底マイクロタイタープレート〔コスター (Costar), ケムブリッジ, MA〕中に1~2×10<sup>5</sup>細胞/ウェルの濃度でプレートインキュベーションした。37℃で1時間インキュベートした後、18ゲージ針を使って非付着細胞を吸引除去し、次いでモノサイト層を血清不含のRPMI-1640培地で2回洗浄し、これにより、モノサイトに種々濃度の候補アクチベーター、例えばGM-CSF, IFN- $\gamma$ , LPS またはIFN- $\gamma$ と組合

せたLPSよりなる試験サンプルを、以下に詳述する如く添加する準備を終了した。

#### 実施例 2

##### 組換えGM-CSFの調製

GM-CSF 遺伝子の実質的完全コード領域および3'-隣接領域を第1図のcDNAクローンから取り出し、これを使用して酵母宿主細胞中でGM-CSFの発現を指令させるための、pYafGM-2と命名された組換え発現プラスミドを形成した。pYafGM-2発現プラスミドは、受託番号 $\Delta$ 53157でATCCに寄託された。第2図に示される如く、pYafGM-2は、プラスミドpBR322からの複製起点およびAp<sup>r</sup>抵抗遺伝子を包含する（太線部）。この発現プラスミドは酵母2 $\mu$ 環の複製起点および形質転換酵母宿主の選択のためのTrpI遺伝子 (TRP-[Trp-栄養要求株]、第2図における細線部)も有する。この発現プラスミドはさらに、GM-CSFの転写および分泌を指令するために使用する酵母 $\alpha$ -因子プロモーターおよびリーダー配列（点線部）も含む。GM-CSF

配列（ハッチング線部）は、後に詳述する如く、合成オリゴヌクレオチド（空線部）によつて、 $\alpha$ -因子配列と融合されている。

上に述べたとおり、GM-CSF 遺伝子のSfaNIからNcoI部位までのコード領域は、pHG23クローンから、SfaNIおよびNcoI制限酵素を使用して標準手法、例えばマニアチル等、モレキュラークローニング、アラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー, N.Y.に記載された手法で除去された。SfaNI 酵素は、pHG23クローンからGM-CSF 遺伝子を開裂するが、その部位は成熟蛋白質（ヌクレオチド $\Delta$ 14）のコード領域の5'末端から2ヌクレオチド下流である；何故なら、ヌクレオチド $\Delta$ 14には、厳密に相当する制限部位が存在しないからである。成熟GM-CSF 遺伝子のコード領域の5'末端部に再付加するため、および第二 $\alpha$ -因子プロセッシング部位を付加して成熟型GM-CSFの分泌のためのシグナル配列の完全プロセッシングを得るため、一つの $\alpha$

リボヌクレオチドを化学合成した。このオリゴヌクレオチドの組成は、下記表1および第2図(空枠部)に示すとおり、HindIII 接着5'末端を有し、これに続くTCT TTG GAT AAA AGAの配列よりなるカテプシンB様成熟サイト、それに続く成熟GM-CSF蛋白質の最初の二つのアミノ酸残基をコードするSfaNI 3'接着末端を有する。表1に示すオリゴヌクレオチドは、スード(Sood)等, Nucl. Acad. Res., 4:2557(1977)およびヒロセ(Hirose)等, Tet. Lett., 28:2449(1978)により記載されているトリエステル法で化学合成された; このオリゴヌクレオチドは他の方法、例えばホスホジエステル法で調製もできる。

表 1

5'- A GCT TCT TTG GAT AAA AGA GC	-3'
AGA AAC CTA TTT TCT CGT GGG	
Ser Leu Asp Lys Arg Ala Pro	

次いで酵母細胞を1/10容量のSED(1M ソルビトール, 25mMエチレンジアミンテトラアセテート(EDTA)(pH8.0), および50mMジチオスレイトール)に濃度を高めて懸濁し、30℃で10分間インキュベートした。細胞-バッファー混合物を次に5分間300×gで遠心した。ペレットを1度1/10容量の1Mソルビトールで洗浄し、細胞をSCE(1M ソルビトール, 0.1Mクエン酸ナトリウム[pH5.8], 0.01MEDTA)20ml中に再懸濁した。細胞壁を破壊するため、グルセラゼを10<sup>-3</sup>容量で溶液に加え、次いで時々おだやかに振りながら30℃で30分間インキュベートした。スフェロプラストの存在は、10μlの酵母細胞を5%SDS(w/v)1滴中に希釈し、顕微鏡スライド上で400倍位相コントラストでゴーストの存在を観察して確認した。細胞混合物を次いで300×gで3分間遠心した。得られたペレットを1/10容量の1Mソルビトールで2回、そしてCaS(1M ソルビトール, 10mM CaCl<sub>2</sub>)で1回洗浄した。

同じ発現ベクターの製造のため他の標準的組換えDNA技術が使用できること、および上記詳述の製法は説明のためのもので、pYafGM-2発現ベクターへの挿入のためまたは他のバクテリアもしくは哺乳動物ベクター中での発現のための種々の方法の非限定的例示にすぎないことを理解すべきである。

pYafGM-2ベクターは、標準技術でTrp<sup>+</sup>形質転換体の選択のため、S. セレビシエの酵母株79(α, Trp1-1, Leu2-1)中に形質転換した。形質転換の前に、79株を選択培地(YNB-trp, 0.67%イーストナイトロジェンベース(デیفコラプス, デトロイト, MI), 0.5%カザミノ酸, 2%グルコース, 10μg/ml アデニンおよび20μg/mlウラシル)または富化培地(YPD, 1%イーストエキス, 2%ペプトンおよび2%グルコース, 80μg/ml アデニンおよび80μg/ml ウラシル補強)のいずれかで増殖させた。細胞を22℃で1000×g, 5分間遠心して収穫し、次いで得られたペレットを滅菌蒸留水で洗浄した。

次に、ベッグス(Beggs)(前術)の方法を応用して、先に製造したプラスミドベクターで形質転換した。ペレット化したスフェロプラストを1/200容量のCaS中に懸濁し、100μlのアリコートに分けて1.5mlエツペンドルフ管に入れた。各アリコートに1~10μlのプラスミドDNA(0.5ないし5ng)を添加した。混合物を室温で10分間インキュベートし、次いで各アリコートへDNAの取り込みを促進するため1mlのPEG(20%PEG4000, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM トリス-HCl(pH7.4))を加えた。室温で10分間置いた後、混合物を5分間350×gで遠心した。得られたペレットを150μlのSOS(10mlの2Mソルビトール, 6.7ml YEPD(1%(w/v)イーストエキス, 2%(w/v)ペプトン, 2%(w/v)グルコース), 0.13mlの1M CaCl<sub>2</sub>, 27μlの1%トリブトファンおよび3.7mlの水)中に再懸濁させた。この混合物を30℃で20分間インキュベートした。次いで細胞のプレーティングを行った。

プレーティング前に、プロトプラスト/DNA混

合物の選択プレートを37℃で予備インキュベートした。18.2 mlのソルビトール、2 mgの寒天、0.6 gのデフコイーストナイトロジェンベース（アミノ酸不含）、2 gのグルコース、0.1 mlの1%アデニン、0.4 mlの1%ウラシルおよび必要なアミノ酸よりなる3 mlの溶融重層用寒天（45℃）を、各アリの細胞の形質転換細胞に加え、試験管内容物を上記選択プレート上に注加した。プレートを30℃で2ないし4日間インキュベートした。このTrpマイナス培地中で増殖するコロニーが、Trp1遺伝子を有するプラスミド即ち、形質転換されたプラスミドを含んでいた。

生物学および殺菌場アッセイの前に、形質転換体を、20~50 mlの富化培地中で30℃で定常段階まで増殖させた。収穫の時点でプロテアーゼインヒビターフェニルメチルスルホニル・フルオリド（PMSF）およびペプスタチンAを、終濃度がそれぞれ1 mMおよび10 μMとなるよう添加した。次いで細胞を400×gの遠心分離で除去し、培地を0.45 μセルロースアセテートフィルター（コー

ニング・グラス・ワークス、コーニング、NY）で濾過した。除菌した上澄を4℃で保存した。

### 実施例 3

#### コロニーアッセイ

実施例3における酵母の培養物から収穫したヒトGM-CSFの存在を、培養物上澄が寒天中でヒト骨髓細胞コロニーの増殖を刺激する能力の検定により確認した。この検定で使用するため、健康提供者の腸骨稜からのヒト骨髓をヘパリン化シリンジで採取した。この骨髓を室温でリン緩衝塩溶液（PBS）で1:3に希釈し、54%パーコール（ファルマシア・ファイン・ケミカルズ）の溶液に上重ねた。500×gで20分間室温で遠心分離した後、層間部分を回収し、20倍量のPBSで洗浄した。次に懸濁液を室温で250×g、10分間遠心した。次に細胞をヌクレオチドを含むα-ミニマル・エッセンシャル・メディアム（α-Mem、ギブコ）10 mlに再懸濁し、細胞数と生存数を測定した。次にFCSを加え、細胞懸濁液をアッセイのときまで氷上に保存した。

アッセイにおいては、上記のように調製した骨髓細胞を、次の組成のインキュベーション培地に最終濃度 $1 \times 10^5$ /mlとなるよう添加した：

(a) 28.1% FCS,  $0.7 \times 10^{-4}$  Mの2-メルカプトエタノール、0.12 mg/ml アスパラギン、0.7 mg/ml グルタミン、150単位のペニシリンG、150単位のストレプトマイシン、ヌクレオチド含有の1.1×α-MEM、および2.2×ビタミン（ギブコ）を含む溶液7部；および(b) 1.4% バクト-アガー溶液（デフコ）3部。培養物を5%CO<sub>2</sub>の存在する湿潤空気下で37℃でインキュベートした。7ないし14日間の培養の後、コロニーの数およびタイプ（グラニューロサイト、マクロファージまたは混合グラニューロサイト-マクロファージ）を決定した。本発明者らは、pYαfGM-2クローンからのGM-CSF遺伝子が $1.25 \times 10^6$ コロニー形成単位/ $10^5$ （CFU-c/ml）の高レベルでGM-CSF活性の生産を指令することを見出した。この活性レベルは、最大コロニー数の50%を与える希釈の逆数を50倍して求めた値である。本発

明者らは、 $1 \times 10^5$  骨髓細胞からの平均コロニー数は $96 \pm 29$ であることを見出した。組換えGM-CSFにより14日目に形成されたコロニーは、区別可能であり、次の三種のタイプよりなっていた：約 $\frac{1}{3}$ の混合グラニューロサイト-マクロファージコロニー；約 $\frac{1}{3}$ のかたまつたグラニューロサイトコロニー；および約 $\frac{1}{3}$ の分散したマクロファージコロニー。

本発明の発現系の対照として、GM-CSF配列を欠くこと以外はpYαfGM-2と同一のプラスミドも酵母79株中に形質転換した。この酵母からの培養上澄は、骨髓コロニー形成試験でGM-CSF活性を示さなかつた。

### 実施例 4

#### 組換えGM-CSFの精製

分泌された組換えGM-CSFを含有する実施例2からの培地をTFA中で1%にして、0.45 μのフィルター（コーニング・グラス・ワークス）で濾過した。次いでこの培地を直接にビダックC4逆相カラム（10 μパッキング付きの1.0×30 cm

ステンレススチールカラムまたはウォーターズ・ラジアル・コンプレッション・カートリッジ (Waters radial compression cartridge) (ウォーターズ・アソシエート, ミルフォード, ME) に 50  $\mu$  ビダック C 4 パッキングを付けたカラム)へ、ミルトン・ロイ・ポンプ (Milton Roy pump) [ラプ・データ・コントロール (Lab. Data Control), リベリア・ビーチ, FL] を使つて、5 ml/分の流速で送つた。1度に 1  $\ell$  までの培地を適用し、カラムへの全蛋白負荷量は、一般に約 20 mg であつた。このカラムを 0.1% TFA で洗浄して 214 nm の吸光度がベースライン (蛋白負荷前) にもどるまで洗浄を続け、非結合サンプル成分を除去した。結合蛋白質の溶出は、0.1% TFA 中の 0-95% (v/v) アセトニトリルの直線勾配 (1% アセトニトリル/分) で行つた。この勾配は、モデル 680 グラジエントフォーマー、2M-45 ポンプおよび 214 nm でモニターするモデル 414 デテクターにより構成されたウォーターズ・リクイド・クロマトグラフによつて作成

227:680 (1970) に記載された方法による 12% ポリアクリルアミドゲル上の電気泳動を行つた。各フラクション番号についてゲルサンプルをオークリー (Oakley) 等, Anal. Biochem., 105:361-364 (1980) に記載された方法で銀染色した。GM-CSF の実質的均一性は、電気泳動および銀染色によつて確認され、それによればグリコシル化 (21,000 ダルトン) および非グリコシル化 (17,000 ダルトン) の GM-CSF に相当する二つの蛋白バンドを生じた (第 5 図参照)。この均一物質の活性を前記実施例 3 のコロニー形成試験で分析したところ、約  $1.5 \times 10^7$  CFU $^{-c}$ /ml であり、比活性は  $1.5 \times 10^6$  CFU $^{-c}$ / $\mu$ g 蛋白質であつた。pI 値は約 5.0 ないし 5.4 であつた。

#### 実施例 5

##### 標識標的細胞の調製

標的細胞は、5% 血清強化 RPMI 1640 培地中、5% CO<sub>2</sub> を含む湿潤空気中で 37°C に保持した。培養標的細胞が対数増殖期にあるとき、細胞毒性試験を行つた。標的細胞は、ヒトメラノーマ細胞

した。ピークの蛋白フラクションは 50 ないし 60% アセトニトリルで見られた。

第 1 回の HPLC から得られた GM-CSF を含むピークフラクションを集めて 0.1% TFA 水溶液 (v/v) で 1:3 に希釈し、この活性部分を、同様の TFA とアセトニトリルの勾配で、ビダック C 18 カラム (3.9mm  $\times$  15cm カラム, 5  $\mu$  パッキング) での再クロマトグラフィーおよび再溶出した。

各フラクションの蛋白質をフルオレスカミンのアッセイにより分析した。また、ピークフラクションは再度 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびひき続く銀染色によつて分析した。この電気泳動を行うにあたり、溶出の間に各フラクションから 20  $\mu$ l 分を取り出して、その各々に 10% SDS 2ml を添加した後真空乾燥した。乾燥残渣を、0.0625M トリス (pH 6.8) ; 2% SDS (w/v) ; 10% グリセロール (v/v) ; 5% 2-メルカプトエタノール (v/v) よりなる非還元性サンプル緩衝液 40  $\mu$ l に溶解した。この溶液を 3 分間煮沸し、レムリ (Laemmli), Nature (London),

ライン A375 (ATCC  $\Delta$  CRL 1619)、ヒト肝臓癌細胞ライン SK-Hep-1 (ATCC  $\Delta$  HTB-52)、ヒト膀胱癌 MIA-PACA-2 (ATCC  $\Delta$  CRL-1420) およびヒト膀胱癌 5637 (ATCC  $\Delta$  HTB-9) を含む。

対数増殖期の標的細胞を  $^{125}$ I-IUdR で放射標識した。放射標識操作において、 $^{125}$ I-IUdR (0.3  $\mu$ Ci/ml ; 比活性 200 mCi/ml ; ニューイングランド・ニュークリアー, ボストン, MA) を含む 5% FCS 強化 RPMI 培地中で 37°C, 24 時間インキュベートした。次に細胞を 2 回洗つて未結合放射標識を除き 0.25% トリプシン (デフコ・ラプス, デトロイト, MI) および 0.02% EDTA によるトリプシン処理を 1 分間行つて収穫した。標識細胞を 5% FCS で強化した RPMI-1640 培地に再懸濁した。

#### 実施例 6

##### 殺腫瘍活性のアッセイ

殺腫瘍活性のアッセイ操作において、実施例 4 からの組換え GM-CSF の試験サンプルの種々の

濃度/希釈のもの200 $\mu$ l、精製天然IFN- $\gamma$  (メロイ・ラボラトリーズ(Meloy Laboratories), スプリングフィールド, VA), LPS (ディフコ・ラブズ., デトロイト, MI, E.coli LPS-N)およびIFN- $\gamma$ と組合せたLPSを、プレートにまかれたモノサイトを含む培養ウェルに添加した。実施例1で記載したとおり、モノサイトに試験サンプルを加える前に、非付着モノサイト細胞は18ゲージ針で吸引して培養ウェルから除去し、次いでモノレアーを血清不含のRPMI-1640で2回ゆすいだ。GM-CSFに関して、アッセイは種々の希釈度の、実施例2で製造したGM-CSF プラスミドを含む酵母の生産する上澄(第3図)および実施例5で製造した精製組換えGM-CSF(第4図)の両方について行つた。第3図および第4図には、LPS, IFN- $\gamma$  およびIFN- $\gamma$ と一緒にしたLPSの希釈物も示されている。対照として、GM-CSF プラスミドを含まない酵母が生産した上澄のアッセイも行つた。試験サンプルを静止中のモノサイトと24時間イン

キュベートした後、試験サンプルを吸引除去した。

約 $10^4$ 個の $^{125}$ I-UdR-標識標的細胞(実施例5からのもの)を各モノサイトのウェルに添加し、初期の標的-エフェクター(活性化モノサイト)の比率を1:10ないし1:20にした。また、放射標識標的細胞単独についても、別の対照群としてプレーティングした。このアッセイは付着標的細胞の溶解を測定するものであり、そのためにはエフェクター細胞と標的細胞との細胞-細胞接触が必要であるため、24時間後に培養上澄を吸引除去して新たなRPMI-1640培地に置き代えることにより、付着せずにこの試験で殺され得ない細胞により生じる可能性のある誤差を防止した。さらに48時間後にモノレアーを激しくゆすいで、モノサイトにより殺された標的細胞を除去した。各ウェル中に残存する付着生存細胞を50 $\mu$ lの0.5M NaOHで溶解した。綿棒で残存放射活性細胞を集め、放射活性を $\gamma$ カウンタで測定した。次の式を用いてモノサイト介在細胞毒性を次の式によつて測定した:

発揮された細胞毒性のパーセント

$$=100 - \frac{\text{活性化モノサイトと培養した標的細胞のcpm}}{\text{休止モノサイトと培養した標的細胞のcpm}} \times 100$$

第3図および第4図にアッセイの結果を示す。第3図に示すとおり、また予測されるとおり、LPSおよびIFN- $\gamma$ は殺腫瘍活性を介在する程度にはマクロファージを活性化しなかつた。さらに既に報告されているとおり、マクロファージ活性化剤としてのIFN- $\gamma$ は、少量のLPSと共に加えたときのみ効果を示した。第3図に更に示すとおり、GM-CSF プラスミドを含む酵母が生産した上澄は、マクロファージの腫瘍細胞を殺す作用を誘発したが、対照上澄(GM-CSF プラスミドを含まない酵母が生産したもの)は、マクロファージの細胞毒性を誘発しなかつた。

第4図は精製組換えGM-CSFのドーズタイトルーションの全コースを示す。第4図に示すとおり、1:500,000の希釈においてもなお、精製組換えGM-CSFはマクロファージを活性化して殺腫瘍活性(30CFU-c/ml)を発揮させる能力を有

し、生じた特異的殺細胞活性の最大値の半分の誘発は、約1:1,000,000(15CFU-c/ml)にカラムからのフラクションを希釈したとき得られた。

第3図におけると同様に第4図においてもLPS, IFN- $\gamma$ およびIFN- $\gamma$ プラスLPSの適当な対照が示されている。IFN- $\gamma$ と異なり、GM-CSFは外からのLPSの不存在下でマクロファージを殺腫瘍性に活性化する効果的単一シグナルとして作用した。

#### 実施例 7

##### 殺腫瘍活性のアッセイ-ヒト癌細胞ライン

実施例6に記載されている殺腫瘍活性のアッセイを、ヒト膀胱癌細胞カルシノーマSCaBER(ATCC 46HTB3)に関しても実施した。これらの標的細胞は実施例5に記載されているようにして放射標識した。アッセイを実施例6の方法で、但しA375標的細胞の代りに放射標識したSCaBER標的細胞を使用して実施した。

#### 実施例 8

##### 殺腫瘍活性のアッセイ-ヒトメラノーマ

実施例6および7の殺腫瘍活性のアッセイ法を、ヒト悪性ミエローマ SK-MEL-28(ATCC 46 HTB72)とともに使用した。標的細胞を実施例5に記載したようにして放射標識した。アッセイは実施例6および7に記載した方法で行ったが、標的細胞としてはSK-MEL-28細胞を使用した。

実施例 9

#### 殺腫瘍活性のアッセイ-ヒトヘパトーマ

ヒト肝臓癌 SK-Hep-1(ATCC 46 HTB-52)に関しても、実施例6の殺腫瘍活性のアッセイ法を実施した。標的細胞は実施例5の方法で放射標識した。このアッセイにおいては、GM-CSFは10 ng/ml アッセイ容量の濃度で用いた。各アッセイにおいて約 $10^4$ 個の $^{125}\text{I}$ Udr-標識標的細胞を各アッセイで使用して、初期の標的-エフェクター(活性化モノサイト)細胞の比率を1:20ないし1:30にした。また、放射標識標的細胞のみも、対照としてプレーティングした。このアッセイにおいて、GM-CSF 活性化モノサイトは、平均して約14%のレベルの腫瘍細胞の特異的殺細胞性を介在した。

導性へ活性化する有効な単独シグナルとして作用することを示している。

#### 4. [図面の簡単な説明]

第1図は、3'非コード領域を含む、ヒトGM-CSF遺伝子のヌクレオチド配列および相当するアミノ酸配列を示す図であり、

第2図は、機能的ヒトGM-CSFを発現させるために宿主細胞を形質転換するために挿入されたGM-CSF遺伝子のコード領域を有するpYα1GM-2発現プラスミドの模式図であり、

第3図は、組換えヒトGM-CSFで活性化されたヒト末梢血液マクロファージにより介在される腫瘍細胞の特異的溶解のパーセントを示すグラフであり、

第4図は、精製された組換えヒトGM-CSFの種々の濃度で活性化されたヒト末梢血液マクロファージに介在される腫瘍細胞の特異的溶解およびLPS, IFN- $\gamma$  およびLPSと組合せたIFN- $\gamma$ で活性化されたマクロファージに介在される同様な溶解を示すグラフであり、

細胞性を介在した。

#### 実施例 10

#### 殺腫瘍活性のアッセイ-ヒト膀胱癌

実施例9の殺腫瘍アッセイ法を、ヒト膀胱癌細胞ラインMIA PACA-2(ATCC 46 CRL1420)について行つた。標的細胞は実施例5に詳述したとおり放射標識した。アッセイは実施例9の方法で行つたが、但し標的細胞にはMIA PACA-2細胞を用いた。この特定のアッセイにおいて、生じた細胞毒性の平均パーセントは約38%であつた。

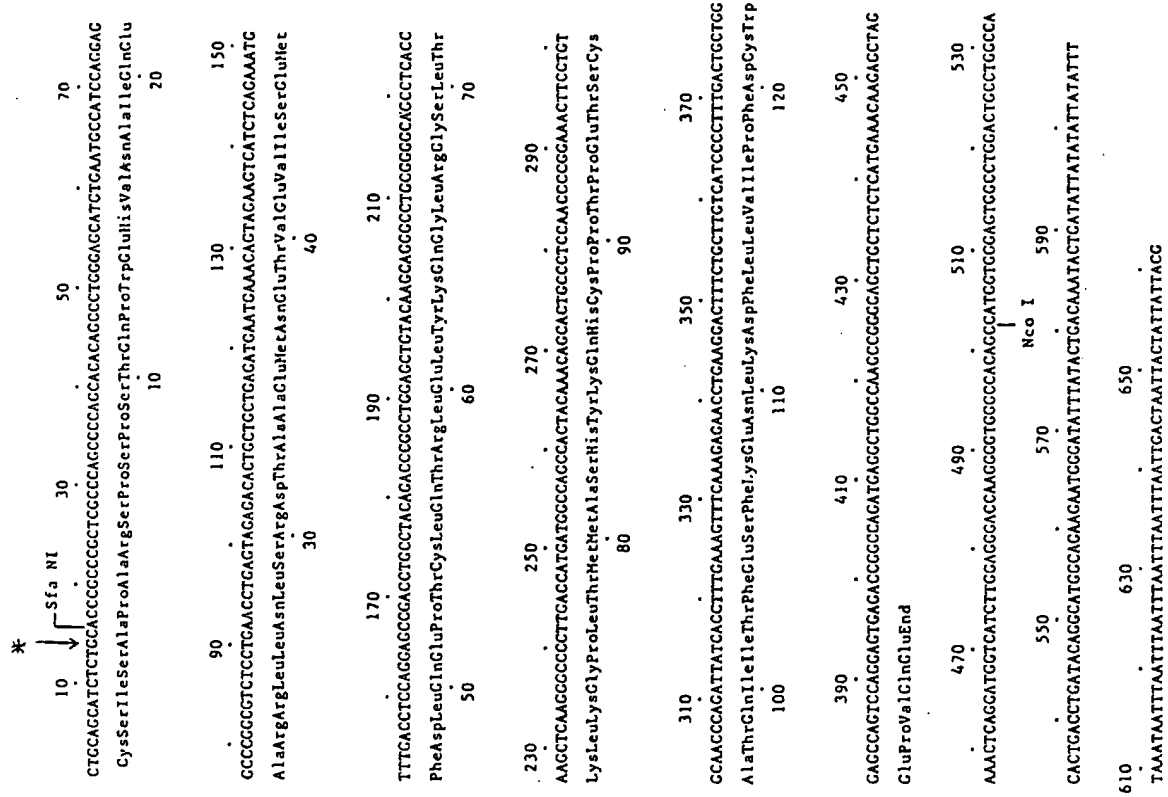
#### 実施例 11

#### 殺腫瘍活性のアッセイ-ヒト膀胱癌

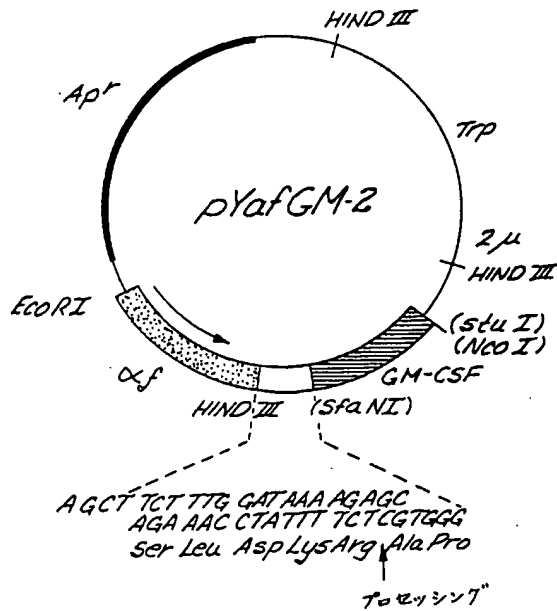
実施例9の殺腫瘍活性アッセイを、ヒト膀胱癌細胞ライン5637(ATCC 46 HTB-9)についても使用した。標的細胞は実施例5のようにして標識した。アッセイは実施例9のようにして行つたが、但し標的細胞には5637細胞を用いた。このアッセイにおいて、生じた細胞毒性のパーセントは約30%であつた。このアッセイ並びに上述のアッセイは、GM-CSFがマクロファージを殺腫

第5図は、精製された均一組換えGM-CSFの銀染色されたポリアクリルアミドゲルバンドを示す電気泳動図である。

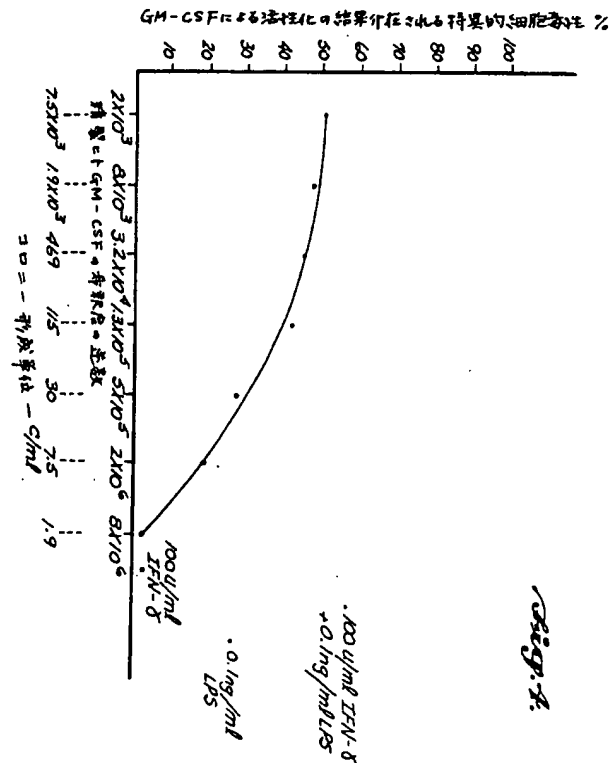
代理人 井埋士 湯 浅 恭 三  
(外5名)



**FIG. 1**



*Fig. 2.*



Aug. 4.

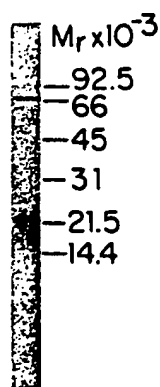
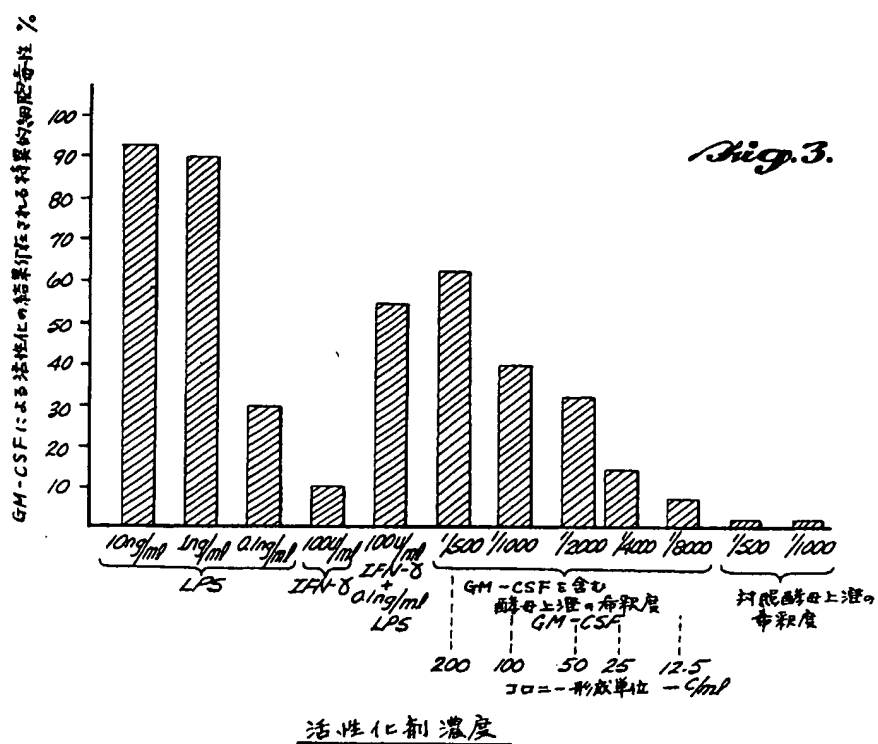


Fig. 5.

第1頁の続き

⑤Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

A 61 K 37/04

7138-4C

優先権主張 ②1986年7月31日③米国(US)④888995

- ⑦発明者 ダグラス・ピー・セレ アメリカ合衆国ワシントン州98199, シアトル, ウエスト・パートナ 2415  
ツテイ
- ⑧発明者 ボール・ジェイ・コン アメリカ合衆国ワシントン州98105, シアトル, スタンフ  
ロン・ザ・サード オード・アベニュー・ノースイースト 4805
- ⑨発明者 デービッド・ジェイ・ アメリカ合衆国ワシントン州98102, シアトル, トウエル  
コスマン ヴス・アベニュー・イースト 310
- ⑩発明者 ケネス・エッチ・グラ アメリカ合衆国ワシントン州98115, シアトル, ノースイ  
ブステイン ースト・セブンティファイフス・ストリート 5829, ナンバ  
ー 443
- ⑪発明者 アルフ・デー・ラー アメリカ合衆国ワシントン州98102, シアトル, サミツ  
セン ト・アベニュー・イースト 320, ナンバー 15
- ⑫発明者 ヴァージニア・エル・ アメリカ合衆国ワシントン州98102, シアトル, ボイア  
ブライス ー・アベニュー・イースト 2617

手続補正書

手続補正書(方式)

昭和61年9月24日

昭和61年11月4日

特許庁長官黒田明雄殿

特許庁長官黒田明雄殿

## 1. 事件の表示

## 1. 事件の表示

昭和61年特許願第 191561号

昭和61年特許願第 191561号 適

## 2. 発明の名称

## 2. 発明の名称

グラニューサイト-マクロファージコロニー刺激因子による  
マクロファージ殺腫瘍作用の活性化グラニューサイト-マクロファージコロニー刺激因子による  
マクロファージ殺腫瘍作用の活性化

## 3. 補正をする者

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

事件との関係 出願人

住所

住所

名称 イミュネックス・コーポレーション

名称 イミュネックス・コーポレーション

## 4. 代理人

## 4. 代理人

住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビル206号室(電話 270-6641-6)  
氏名 (2770) 井理士 湯浅 恭三住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビル206号室

氏名 (2770) 井理士 湯浅 恭三

## 5. 補正の対象

## 5. 補正命令の日付 昭和61年10月28日(発送日)

タイプした明細書

## 6. 補正の対象

図面(第1図)

## 6. 補正の内容

## 7. 補正の内容

別紙の通り(尚、内容には変更なし)

別紙の通り(尚、内容には変更なし)

